

Title	Dynamic Observation of Oxygenation-Induced Contraction of and Fiber-Network Formation-Disassembly in Cultured Human Brain Microvascular Endothelial Cells.
Sub Title	ヒト培養脳微小血管内皮細胞における酸素暴露により誘発される細胞収縮と一過性のファイバーネットワーク形成の動的考察
Author	井上, 幸治
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.35-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0035">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0035</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Dynamic Observation of Oxygenation-Induced Contraction of and Transient Fiber-Network Formation-Disassembly in Cultured Human Brain Microvascular Endothelial Cells.

(ヒト培養脳微小血管内皮細胞における酸素暴露により誘発される細胞収縮と一過性のファイバーネットワーク形成の動的考察)

井上 幸治

## 内容の要旨

我々はこれまでにヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) が酸素飽和度の高い液体に暴露されることで、約20%細胞体が収縮することを報告してきた。今回、同様の変化がヒト培養脳微小血管内皮細胞 (HBEC) ( $n=30$ ) においても認められるかどうかを確認するため実験を行った。HBECの形態学的変化を観察するために、培養細胞を生きた状態で観察することができるビデオ強化型微分干渉 (VECDIC) 顕微鏡を使用した。HBECは第三世代の細胞で播種して4日目のものを使用した。カバーガラス上に蜜でない状態で培養されたHBECを培養し、培地の中に細胞が満たされる状態にした。培地は常に一定の速度で灌流した。顕微鏡のレンズ面から細胞のほぼ中心部を垂直面から観察し、この際の変化をビデオに録画して細胞の変化について観察した。具体的には、何も行わない状態で細胞を20秒から1分観察し、その後注入針を用いて30度の角度で培地の表面に1分あたり数mmの速度で滑らかに純酸素ガスを1分以内の時間で吹きつけ、この時の細胞の変化を観察した。その結果、細胞の細胞膜が膨張してその後皺ができ、細胞の収縮が $14\pm 7\%$ の範囲で認められた ( $p<0.001$ )。細胞の収縮が停止した瞬間に一時的なファイバーネットワークの形成を認めた。これは細胞内にある場所 (おそらく接着ブラーク) から生じて細胞全体に拡大した。ファイバーネットワークの形成は統計学的に有意であった ( $p<0.01$ )。酸素投与の中止後、観察されたファイバーネットワークはすみやかに $3.3\pm 1.2$ 秒のうちに消退し、 $0.5\mu\text{m}$ 以下の小粒子に変化して、その後は細胞内構造物の一部になった。このような変化は30秒以内に終了し、酸素暴露ごとに同じ変化を認めた。同様の変化を生じるかどうか確認するために、培地の流れる速度を $0-200\mu\text{m/s}$ まで変化させてずり応力を変化させる・ろ紙を用いて培地を除去する・循環している培地の温度を $10^\circ\text{C}$ から $40^\circ\text{C}$ まで変化させる・培地に空気を送り込み細胞に振動を与える・細胞に双極電極を使用し $1-100\text{Hz}$ ,  $0.5-3.0\text{V DC/AC}$ の矩形波パルス/三角波パルスの電気刺激を与える、という各種の刺激を加えてみたが、細胞には何ら形態学的変化を生じなかった。著者らは、HBECは一時的な酸素暴露刺激により強く収縮し、その後急速なネットワーク構造の形成・分解を生じたと結論した。今回の実験において認められたHBECの収縮の機序はファイバーネットワークの形成と関連している可能性がある。ファイバーはおそらく細胞骨格であり、それは細胞の腹側面に沿って存在し、末端が接着ブラークに達している微小フィラメントの厚い束で構成されるストレスファイバーと考えられる。今回観察されたファイバーについてはアクチンとビメンチンから構成されているものである可能性があるが、これについては今後細胞・免疫組織化学的手法により確認される必要があると考えられる。

## 論文審査の要旨

脳組織血流の高酸素誘発性変化の機序はこれまで十分解明されていない。脳組織での酸素の影響を検討することを目的として実験を行った。本研究では、培養ヒト脳微小血管内皮細胞 (HBEC, 30細胞) の密でない状態における酸素ガス吹き付け時における細胞の形態学的変化をビデオ強化型微分干渉電子顕微鏡を用いて調べた。HBEC細胞の細胞体の真上にあたる培養液表面に精製純酸素ガスを連続的に低流速暴露すると、内皮細胞には緊張・皺化状態が生じ、細胞体は $14\pm 7\%$  ( $P<0.001$ ) まで強く収縮した。細胞が最大限収縮しそれ以上細胞の収縮が見られなくなった後、急速に細胞内の特定スポットから線維ネットワークの一過性の形成が認められた。この線維ネットワークの出現は統計学的に有意であった。(実験で使った30細胞中26細胞で認めた。 $P<0.05$ ) 酸素供給の中止後、観察された線維ネットワークは迅速に ( $3.3\pm 1.2$ 秒以内) 顆粒状の物質 ( $0.6\pm 0.2\mu\text{m}$ ) へと分解され、その後細胞内構造体の中に完全に融合した。そしてHBEC細胞は対照と同様の外観まで完全に回復した。これらの一連の連続した経過は30秒以内に完了し、この現象は酸素ガスが供給されるごとに各細胞内で再現された。以上より、HBEC細胞は純酸素ガスの吹き付け刺激に反応して収縮し、その後線維ネットワーク構造の迅速な形成及び線維ネットワークの顆粒状物質への分解と細胞構造内への融解を生じると結論した。

審査において実験方法、結果の解釈などについて質問があった。培養血管内皮細胞の収縮をもって毛細血管の径も縮小すると考えて良いのかという質問があり、そのような可能性が考えられるという段階であると回答されたが、これに対し内皮細胞と内皮細胞の間隙が拡大し、物質の透過性が亢進することが生じる可能性の方が高いのではないかと指摘がなされた。内皮細胞の酸素を感受する部位についての質問については詳細は不明であるが、文献上は内皮細胞内のストレスファイバーの部分のみを取り出しATPを添加することで線維が収縮すると報告されており、何らかの機序で酸素投与がATPの産生能を増加させるためではないかと考えられると回答された。今回の実験系では酸素分圧がある一定の圧を超えた瞬間に細胞の収縮を認められていることから、ATPに依存した系というよりも、酸素投与が直接収縮のエネルギー源となり得るような機序を考えられた方がより自然であると考えられ、そのような実験をしてはどうかとの示唆がなされた。また、今回の変化が酸素以外のガスの吹き付けで認められないかと言う点に関しては、空気・窒素ガスの吹き付けでは全く同じような変化は観察されなかったことが回答された。以上のように、本研究は今後更に検討すべき課題があるものの、リアルタイムで初めてヒトの脳微小血管内皮細胞の酸素吹き付けに対する形態学的変化を観察できたものとして、学問的に価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
外科学 河瀬 斌 医化学 末松 誠  
解剖学 仲嶋 一範  
学力確認担当者：  
審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成16年3月9日